

PAT-NO: JP407070170A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 07070170 A

TITLE: NEW ISOFLAVONE DERIVATIVE AND ITS PRODUCTION

PUBN-DATE: March 14, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

HIRAI, KUNIMASA

UESUGI, TAKEHIKO

TODA, TOSHIYA

TERAMOTO, TADAO

OKUDAIRA, TAKENORI

ISHIDA, KINJI

TSUJI, KUNIO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

SHOKUHN SANGYO ECO PROCESS GIJUTSU

N/A

KENKYU KUMIAI

APPL-NO: JP05216150

APPL-DATE: August 31, 1993

INT-CL (IPC): C07H017/07, C12P019/60

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain a new compound expected to have application to medicines, healthy foods, etc., usable for elucidation of action mechanism occurring in a fermentation process of soybeans obtained by extracting the compound from natto (fermented soybeans).

CONSTITUTION: A compound of the formula (R<SB>1</SB> is H or methoxyl; R<SB>2</SB> is H or OH) such as 7-(6-succinyl-β-glucopyranosyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one. The compound, for example, is obtained by extracting soybeans fermented with *Bacillus natto* with an alcohol such as methanol, dissolving the extract in water, successively subjecting the solution to adsorption column chromatography and gel column chromatography, purifying the prepared compound of the formula by reversed phase system column chromatography.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to a new isoflavone derivative and its manufacture approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, presenting bioactive, such as an antioxidation operation, an antibacterial action, an anti-cholesterol operation, tyrosine kinase inhibitory action, a estrogen operation, and osteoclasts depressant action, is reported to the isoflavone derivative.

[0003] for example, about an antioxidation operation Dan E. Pratt and et al., "Source of Antioxidant Activity of Soybeans and Soy Products", J. of Food Science, 44, and p. 1720 (1979); about an antibacterial action Martin Weidenborner, et al. and "Antifungal Activity of Isoflavonoids Against Storage Fungi of The Genus Aspergillus", Phytochemistry, 28, and pp. 3317-3319 (1989); about an anti-cholesterol operation R. D. Sharma, "Isoflavones and Hypercholesterolemia in Rats", Lipids, 14 (6), p. 535 (1978); about tyrosine kinase inhibitory action "The mechanism of action in the cell cycle of isoflavone" besides Kyoichiro Azuma, Cell Science, 8 (8), and 33 (1992); about a estrogen operation Bickoff E. M. and et al., "Relative Potencies of About Several Estrogen-like Compounds found in Forages", J. of Agriculture and Food Chemistry, 10, and 410; (1962) and osteoclasts depressant action M. Tsuda, et al., and "The Effect of Tpriflavone (TC-80) on Bone Resorption in Tissue Culture", J. of Bone and Mineral Research, 1 (2), and p. 207 (1986) Refer to.

[0004] An isoflavone derivative and especially the isoflavone derivative contained in a soybean, A total of 12 kinds of existence of three kinds of glycosides in which the structure of the sugar chain part of each derivative differs from three kinds of aglycons from which a basic frame differs is reported until now. Shigemitsu, et al., "Malonyl Isoflavone Glucosides in Soybean Seeds", Agric. Biol. Chem., and 55 (9) -- [for example,] The present condition is hardly solved about the action mechanism which produces pp. 2227-2233 (1991) in the fermentation process of the soybean of the isoflavone derivative contained in the soybean in spite of reference.

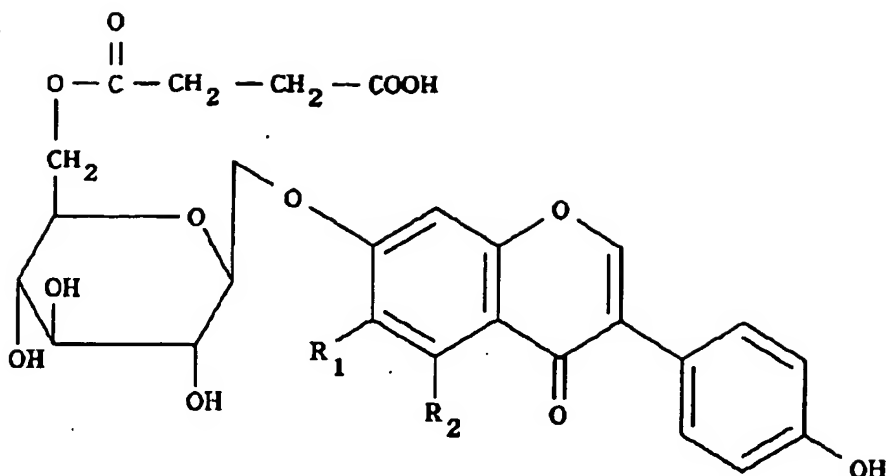
[0005]

[Means for Solving the Problem] This invention is invented very much by carrying out the knowledge of the isoflavone derivative which has the completely new structure which does not exist in the soybean before fermenting in cobwebbing fermented soybeans, as a result of this invention persons' having repeated research for years about the isoflavone derivative in various soybean fermented foods in view of the technical problem in the technical field concerned mentioned above.

[0006] That is, according to this invention, the compound of the following structure expression is offered.

[0007]

[Formula 2]



[0008] R1 in said formula is hydrogen or a methoxyl group, and R2 is hydrogen or a hydroxyl group.

[0009] When analyzed by the high-speed liquid chromatogram method about ten sorts of typical fermented soybeans marketed about this compound at home, it was detected about all fermented soybeans. However, since this compound was not detected at all by other soybean fermented foods (bean paste, soy sauce, tempeh, etc.), it is considered a component peculiar to fermented soybeans.

[0010] Moreover, as compared with the conventionally well-known isoflavone derivative with which the new isoflavone derivative of this invention is contained in an soybean, application of the compound of this invention to goodness as a result drugs, health food, etc. of an absorption coefficient to the inside of the body when the high solubility over water, alcohols, for example, a methanol, or a rare methanol is accepted and takes in the isoflavone derivative of this invention this [whose] is a physiological active substance is expected.

[0011] Furthermore, also about the new isoflavone derivative field manufacture approach of this invention, this invention persons add examination and came to build two kinds of following approaches.

Namely, (1) The alcoholic extract of the soybean fermented with Bacillus natto (common-name name: MIURA, Takahashi, YAYOI, etc.) is refined in order of an adsorption column chromatography and a gel column chromatography, and the mixture containing a new isoflavone derivative is obtained.

[0012] And the column chromatography of an opposition system refines this mixture further, and three sorts of new isoflavone derivatives of this invention are obtained.

[0013] (2) When Bacillus natto is cultivated to the culture medium which added the soybean isoflavone glycoside so that it might become isoflavone of an amount two to 10 times at the hot water extract or this hot water extract of the soybean condensed 2 to 10 times and the concentration of the new isoflavone derivative of this invention becomes the highest to it, end culture.

[0014] Next, the culture medium from which the fungus body was removed is refined in order of an adsorption column chromatography and a gel column chromatography, and the mixture containing a new isoflavone derivative is obtained.

[0015] And the column chromatography of an opposition system refines this mixture further, and three sorts of new isoflavone derivatives of this invention are obtained.

[0016]

[Example] Although the suitable method of preparation of the new isoflavone derivative of this invention is described below, the following example is the thing of the instantiation-purpose and should not be interpreted to the purport which limits this invention.

[0017] Example 1 marketing fermented soybeans The methanol extracted, after freeze-drying and grinding 3.5kg ("** mineral fermented soybeans to which it does not come" (trade name): FUJICCO CO., LTD. make) and degreasing under chloroform under a room temperature.

[0018] Methanol extract 135g is dissolved in distilled water and it is diamond ion. It was made to stick to the column filled up with HP-20 (trade name) (: Mitsubishi Kasei Corp. make), and sequential elution

Primary
2nd day
99%
pure
{26}

was carried out with the methanol and 70% methanol 30%.

[0019] Fractionation which separates 70% methanol effluent with sephadex LH-20 column chromatography (trade name) (: Pharmacia, Inc. make) using the methanol as an elution solvent, and contains many new isoflavone derivatives 555mg was obtained (yield from raw-material fermented soybeans: 0.016%).

[0020] high performance chromatography is further used for this fractionation – the column of an ODS system separated and three sorts of new isoflavone derivatives (purity: 99% or more) were obtained. In addition, the purity of an isoflavone derivative was determined based on the result depended on liquid chromatography and thin-layer chromatography.

[0021] And physicochemical analysis of each isoflavone derivative was performed.

[0022] In addition, it is related with an analysis means and is NMR analysis. JNM-GSX 270 (JEOL Co., Ltd. make) and mass analysis (FAB-MS) JMS-SX 102 (JEOL Co., Ltd. make) and infrared-absorption analysis (IR) used each device of IR-700 ("KBr briquette method": Jasco Corp. make).

[0023] Moreover, the publication about NMR data is due to the comparison with the NMR spectrum data (the following table 1) of an soybean isoflavone glycoside (genistin), and the NMR spectrum data (Table 2 - 4) of each isoflavone derivative.

[0024]

[Table 1]

☆【表1】

表1 : ゲニスチンのNMRデータおよび構造式

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 8.13 (1H, s, 2-H), 7.38 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, 2' and 6'-H),

(CD_3OD , 270MHz) 6.84 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, 3' and 5'-H),

6.70 (1H, d, $J=2.2\text{Hz}$, 8-H),

6.51 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, 6-H),

5.05 (1H, d, $J=5.1\text{Hz}$, 1"-H),

3.91 (1H, dd, $J=11.9$ and 1.9Hz),

3.71 (1H, dd, $J=17.8$ and 5.7Hz), 3.44-3.48 (4H, m)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm) : 180.5 (C-4), 163.0 (C-7), 161.6 (C-5), 157.5 (C-4'),

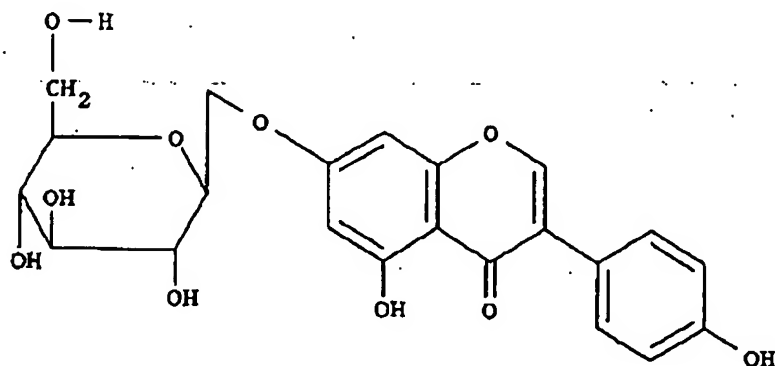
(DMSO-d_6 , 270MHz) 157.2 (C-9), 154.6 (C-2), 130.2 (C-2', 6'),

122.6 (C-3), 121.0 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'),

106.1 (C-10), 99.9 (C-1"), 99.6 (C-6), 94.5 (C-8),

77.2 (C-5"), 76.4 (C-3"), 73.1 (C-2"), 69.6 (C-4"),

60.6 (C-6")



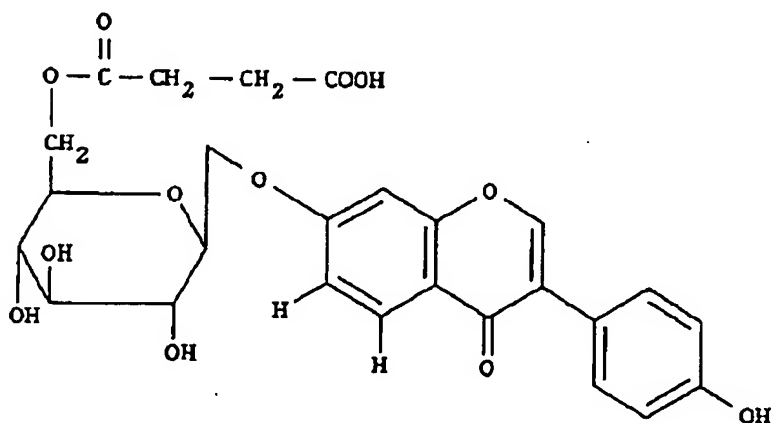
[0025] ** 7-(6-succinyl-beta-guru KOPIRASHINORU)-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1 - Benzopyran -4 -
ON [0026]
[Table 2]

☆【表2】

表2 : 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンのNMRデータおよび構造式

¹H-NMR δ (ppm): 8.16 (1H, s, 2-H), 8.11 (1H, d, J=8.9Hz, 5-H),
 (CD₃OD, 270MHz) 7.37 (2H, d, J=8.6Hz, 2' and 6'-H),
 7.20 (1H, d, J=3.2Hz, 8-H),
 7.16 (1H, dd, J=8.9 and 2.4Hz, 6-H),
 6.84 (2H, d, J=8.4Hz, 3' and 5'-H),
 5.07 (1H, d, J=7.8Hz, 1''-H),
 4.54 (1H, dd, J=10.0 and 2.4Hz, 6''-H),
 4.20 (1H, dd, J=11.9 and 7.6Hz, 6''-HB),
 3.77 (1H, dt, J=7.6 and 2.4Hz, 5''-H),
 3.38-3.55 (3H, m, 2'', 3'' and 4''-H),
 2.57-2.71 (4H, m, 2'' and 3''-H)

¹³C-NMR δ (ppm) : 178.0 (C-4), 176.0 (C-4''), 174.0 (C-1''),
 (CD₃OD, 270MHz) 163.2 (C-7), 159.1 (C-4'), 158.7 (C-9),
 155.0 (C-2), 131.4 (C-2'6'), 128.3 (C-5),
 126.1 (C-3), 124.1 (C-1'), 120.2 (C-10), 117.1 (C-6),
 116.2 (C-3', 5'), 104.9 (C-8), 101.6 (C-1''),
 77.7 (C-5''), 75.6 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.6 (C-4''),
 65.0 (C-6''), 30.1 (C-2''), 29.8 (C-3'')



[0027] The difference with the NMR spectrum data of the result of the above-mentioned table 2 to genistin was as follows.

[0028] ¹H-NMR:(CD₃OD, 270MHz) ppm Display 'delta' Value.

[0029] 8.11 Set to 1H, d, J= 8.9Hz, 5-H, and 7.16 (1H, dd, J= 8.9, and 2.4Hz, 6-H), and it is the

appearance of a new signal.

[0030] ¹³C-NMR:(CD₃OD, 270MHz) ppm Display 'delta' Value.

[0031] 128.3 C- 5, 120.2 (C-10), and 117.1 (C-6) setting -- appearance of a new signal.

[0032] Moreover, the following numeric value was acquired about the melting point of this compound, mass analysis, and infrared-absorption analysis (the maximum absorption wavelength).

[0033] Melting point: 231-degree-CFAB mass (m/z) : [- ON] 517+(C₂₅H₂₄O₁₂+H) IR nu (cm-1):

3370, 2360, 2318, 1730, 1621, 1524, 1445, 1247, 1070, 885, 830.** 7-(6-succinyl-beta- guru

KOPIRASHINORU)-5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1.- Benzopyran -4 [0034]

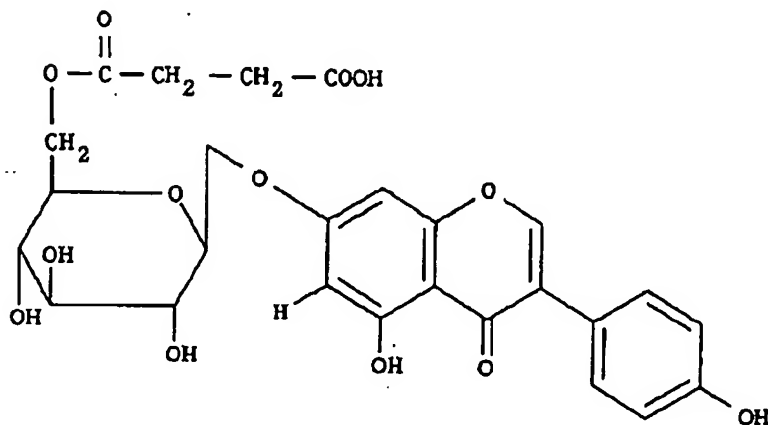
[Table 3]

☆【表3】

表3 : 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-5-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンのNMRデータおよび構造式

¹H-NMR δ (ppm): 8.10 (1H, s, 2-H), 7.38 (2H, d, J=8.1Hz, 2' and 6'-H),
 (CD₃OD, 270MHz) 6.84 (2H, d, J=7.8Hz, 3' and 5'-H), 6.66 (1H, s, 8-H),
 6.48 (1H, d, J=1.2Hz, 6-H), 4.99 (1H, d, J=5.1Hz, 1''-H),
 4.55 (1H, dd, J=10.3 and 1.1Hz, 6''-HA),
 4.22 (1H, dd, J=11.9 and 7.6Hz, 6''-HB),
 3.71-3.76 (1H, m, 5''-H), 3.34-3.54 (3H, m, 2'', 3' and 4''-H),
 2.60-2.68 (4H, m, 2''' and 3'''-H)

¹³C-NMR δ (ppm): 182.2 (C-4), 137.7 (C-1'' and 4''), 164.2 (C-7),
 (CD₃OD, 270MHz) 163.3 (C-5), 158.9 (C-4'), 158.6 (C-9),
 154.9 (C-2), 131.1 (C-2', 6'), 124.8 (C-3),
 122.7 (C-1'), 116.1 (C-3', 5'), 107.9 (C-10),
 101.2 (C-1''), 101.0 (C-6), 95.7 (C-8), 77.5 (C-5''),
 75.4 (C-3''), 74.3 (C-2''), 71.3 (C-4''), 64.7 (C-6''),
 30.0 (C-2'''), 29.8 (C-3''')



[0035] The difference with the NMR spectrum data of the result of the above-mentioned table 3 to genistin was as follows.

[0036] ¹H-NMR:(CD₃OD, 270MHz) ppm Display 'delta' Value.

[0037] 6.48 Set to 1H, d, J= 1.2Hz, and 6-H, and it is the appearance of a new signal.

[0038] ¹³C-NMR:(CD₃OD, 270MHz) ppm Display 'delta' Value.

[0039] It sets to 163.3 (C-5), 107.9 (C-10), and 101.0 (C-6), and is the appearance of a new signal.

[0040] Moreover, the following numeric value was acquired about the melting point of this compound, mass analysis, and infrared-absorption analysis (the maximum absorption wavelength).

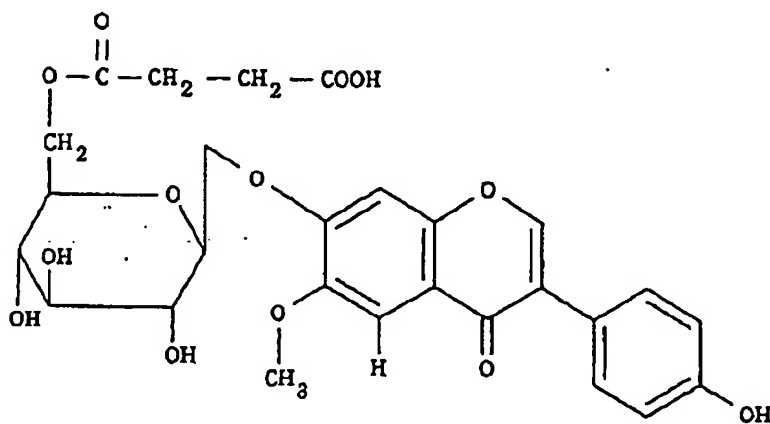
[0041] Melting point: 228-degree-CFAB mass (m/z) : 533+(C₂₅H₂₄O₁₃+H) IR nu (cm⁻¹): 3432, 1714, 1648, 1612, 1515, 1441, 1251, 1175, 1074, 837.** 7-(6-succinyl-beta- guru KOPIRASHINORU)-3-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-4H-1-benzopyran -4 - ON [0042]

[Table 4]

☆【表4】

表4 : 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-
6-メトキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンのNMRデータおよび構造式

¹H-NMR δ (ppm): 8.22 (1H, s, 2-H), 7.63 (1H, s, 5-H),
(CD₃OD, 270MHz) 7.40 (2H, d, J=8.6Hz, 2' and 6'-H),
7.33 (1H, s, 8-H), 6.85 (2H, d, J=8.9Hz, 3' and 5'-H),
5.11 (1H, d, J=7.6Hz, 1''-H),
4.53 (1H, dd, J=[1.9, 1.9]Hz, 6''-HA),
4.19 (1H, dd, J=11.9, 7.6Hz, 6''-HB), 3.86 (3H, s, OMe-H),
3.76-3.82 (1H, m, 5''-H),
3.34-3.63 (3H, m, 2'', 3'' and 4''-H),
2.56-2.71 (4H, m, 2''' and 3'''-H)



[0043] The difference with the NMR spectrum data of the result of the above-mentioned table 4 to genistin was as follows.

[0044] ¹H-NMR:(CD₃OD, 270MHz) ppm Display 'delta' Value.

[0045] 3.86 Set to 3H, s, and OMe-H, and it is the appearance of a new signal.

[0046]

[Effect of the Invention] Various effectiveness – a new physiological operation can also completely be expected and it can contribute industrially and scientifically that it can become an aid of an elucidation of the action mechanism further produced in the fermentation process of the soybean of an isoflavone derivative etc. -- is done so not to mention the well-known physiological operation which the conventional isoflavone derivative presents by having offered the new isoflavone derivative obtained from the soybean after fermentation (fermented soybeans) by this invention.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-70170

(43) 公開日 平成7年(1995)3月14日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 17/07				
C 1 2 P 19/60		7432-4B		
// (C 1 2 P 19/60				
C 1 2 R 1:125)				

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平5-216150

(22) 出願日 平成5年(1993)8月31日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年3月5日、
 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌67巻
 3号」に発表

(71) 出願人 593120512

食品産業エコ・プロセス技術研究組合
 東京都中央区日本橋小伝馬町17番17号 峰
 沢ビル4階

(72) 発明者 平井 邦昌

兵庫県明石市大久保町松陰1119-4-104

(72) 発明者 植杉 岳彦

静岡県静岡市谷田40-1-308

(72) 発明者 戸田 登志也

兵庫県西宮市大社町2-12-201

(72) 発明者 寺本 忠夫

兵庫県川西市湯山台1-32-5

(74) 代理人 弁理士 角田 嘉宏

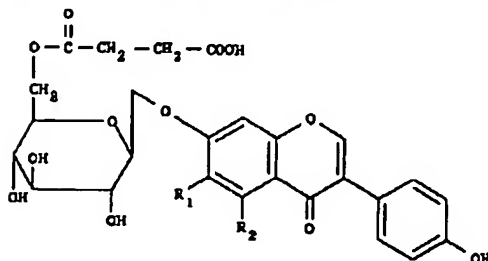
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規イソフラボン誘導体およびその製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 新規イソフラボン誘導体およびその製造方法
 を提供する。

【構成】 右記の構造式を有するイソフラボン誘導体、
 および納豆菌で発酵させた大豆のアルコール抽出物、あ
 るいは大豆の熱水抽出液とイソフラボン配糖体を添加し
 た培地で培養した納豆菌の培養液を精製することよりな
 る当該イソフラボン誘導体の製造方法。

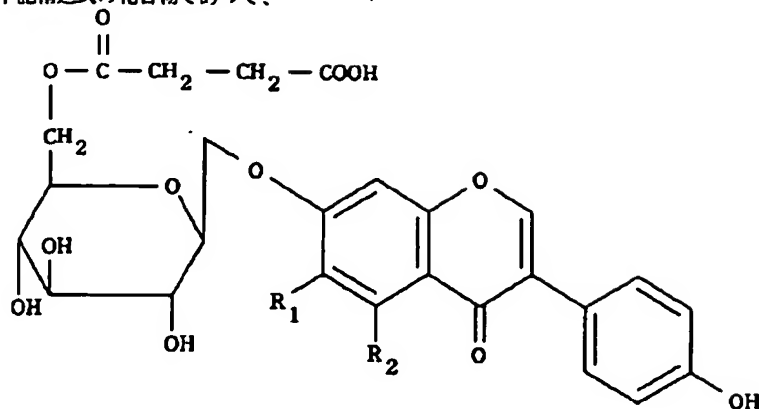


(R₁ ; 水素あるいはメトキシル基、R₂ ; 水素あるい
 は水酸基)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記構造式の化合物であって、

*【化1】



前記式中のR₁は水素あるいはメトキシ基であり、R₂は水素あるいは水酸基であるイソフラボン誘導体。

【請求項2】 前記イソフラボン誘導体が、7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン；7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-5-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン；あるいは7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-6-メトキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン、である請求項1に記載のイソフラボン誘導体。

【請求項3】 イソフラボン誘導体の製造方法であって、下記工程を含む、すなわち、(a) 大豆を、納豆菌 (*Bacillus subtilis*)で発酵させ、(b) 前記納豆菌で発酵させた大豆を、アルコール抽出し、(c) 前記工程(b)で得られたアルコール抽出物を、吸着カラムクロマトグラフィーで精製し、および(d) 前記工程(c)で得られた精製物を、ゲルカラムクロマトグラフィーで精製する工程を含む、ことを特徴とするイソフラボン誘導体の製造方法。

【請求項4】 イソフラボン誘導体の製造方法であって、下記工程を含む、すなわち、(a) 濃縮した大豆の熱水抽出液あるいは該熱水抽出液に大豆イソフラボン配糖体を添加した培地にて、納豆菌 (*Bacillus subtilis*)を培養し、(b) 前記工程(a)で得られた培養液から菌体を除去し、(c) 前記工程(b)で得られた培養液を、吸着カラムクロマトグラフィーで精製し、および(d) 前記工程(c)で得られた精製物を、ゲルカラムクロマトグラフィーで精製する工程を含む、ことを特徴とするイソフラボン誘導体の製造方法。

【請求項5】 前記製造方法が、(e) 前記ゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた精製物を、逆相系のカラムクロマトグラフィーで精製する工程をさらに含む、ことを特徴とする請求項3もしくは4に記載のイソフラボン誘導体の製造方法。

※【請求項6】 前記イソフラボン誘導体が、7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン；7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-5-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン；あるいは7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-6-メトキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン、である請求項3ないし5のいずれかに記載のイソフラボン誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規のイソフラボン誘導体およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】従来より、イソフラボン誘導体には、抗酸化作用、抗菌作用、抗コレステロール作用、チロシンキナーゼ阻害作用、エストロゲン作用、および骨吸収抑制作用等の生理活性を呈することが報告されている。

【0003】例えば、抗酸化作用については、Dan E. Pratt, et al., "Source of Antioxidant Activity of Soybeans and Soy Products", J. of Food Science, 44, p.1720 (1979)；抗菌作用については、Martin Weidenborner, et al., "Antifungal Activity of Isoflavonoids Against Storage Fungi of The Genus *Aspergillus*", Phytochemistry, 28, pp.3317-3319 (1989)；抗コレステロール作用については、R.D. Sharma, "Isoflavones and Hypercholesterolemia in Rats", Lipids, 14 (6), p.535 (1978)；チロシンキナーゼ阻害作用については、東恭一郎、他、「イソフラボン類の細胞周期における作用機構」、Cell Science, 8(8), 33 (1992)；エストロゲン作用については、Bickoff E.M., et al., "Relative Potencies of Several Estrogen-like Compounds found in Forages", J. of Agriculture and Food Chemistry, 10, 410 (1962)；および骨吸収抑制作用につい

※50

ては、M. Tsuda, et al., "The Effect of Tpriflavone (TC-80) on Bone Resorption in Tissue Culture", J. of Bone and Mineral Research, 1(2), p.207 (1986). を参照のこと。

【0004】イソフラボン誘導体、特に、大豆に含まれるイソフラボン誘導体は、基本骨格の異なる三種類のアグリコンと、各誘導体の糖鎖部分の構造の異なる三種類の配糖体の合計12種類の存在がこれまでに報告されている(例えば、Shigemitsu, et al., "Malonyl Isoflavone Glucosides in Soybean Seeds", Agric. Biol. Chem, 5 10 5(9), pp.2227-2233 (1991)を参照)にもかかわらず、大豆に含まれているイソフラボン誘導体の大豆の発酵過程に生ずる作用機序については、ほとんど解明されてい*

*なかったのが現状である。

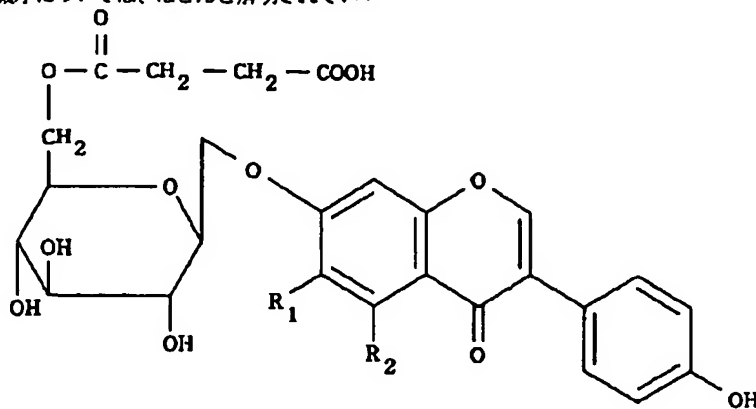
【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は上述した当該技術分野における課題に鑑みて、本発明者らが、様々な大豆発酵食品中のイソフラボン誘導体について長年研究を重ねた結果、糸引き納豆中に発酵前的大豆中には存在しない全く新規な構造を有するイソフラボン誘導体を知見するに至って発明されたものである。

【0006】すなわち、本発明によれば、下記構造式の化合物が提供される。

【0007】

【化2】



【0008】前記式中のR₁は水素あるいはメトキシル基であり、R₂は水素あるいは水酸基である。

【0009】この化合物について、国内で市販されている代表的な10種の納豆について高速液体クロマトグラム法により分析したところ、すべての納豆について検出された。しかしながら、この化合物は、他の大豆発酵食品(味噌・醤油・テンペ等)には全く検出されなかったことから、納豆に特有の成分と思料される。

【0010】また、本発明の新規イソフラボン誘導体は、大豆に含まれる従来公知のイソフラボン誘導体と比較して、水やアルコール類、例えば、メタノールあるいは希メタノール、に対する高い溶解性が認められ、このことは、生理活性物質である本発明のイソフラボン誘導体を摂取した場合の体内への吸収率の良さ、ひいては医薬品や健康食品などへの本発明の化合物の応用が期待されるものである。

【0011】さらに、本発明の新規イソフラボン誘導体野製造方法についても、本発明者らは検討を加え、以下の二種類の方法を構築するに至った。すなわち、(1) 納豆菌(通称名: ミウラ、タカハシ、ヤヨイなど)で発酵させた大豆のアルコール抽出物を、吸着カラムクロマトグラフィー、ゲルカラムクロマトグラフィーの順で精製して、新規イソフラボン誘導体を含む混合物を得る。

※【0012】そして、この混合物をさらに、逆相系のカラムクロマトグラフィーで精製して、本発明の三種の新規イソフラボン誘導体を得る。

【0013】(2) 2~10倍に濃縮した大豆の熱水抽出液、あるいは該熱水抽出液に2~10倍量のイソフラボンになるように大豆イソフラボン配糖体を添加した培地に、納豆菌を培養し、本発明の新規イソフラボン誘導体の濃度が最高になった時に培養を終了する。

【0014】次に、菌体を除去した培養液を、吸着カラムクロマトグラフィー、ゲルカラムクロマトグラフィーの順で精製して、新規イソフラボン誘導体を含む混合物を得る。

【0015】そして、この混合物をさらに、逆相系のカラムクロマトグラフィーで精製して、本発明の三種の新規イソフラボン誘導体を得る。

【0016】

【実施例】以下に本発明の新規イソフラボン誘導体の好適な調製法を述べるが、下記実施例は、例示的な目的のものであり、本発明を限定する旨に解釈すべきでない。

【0017】実施例1

市販納豆 3.5Kg(「こんぶミネラル納豆」(商品名): フジッコ株式会社製)を凍結乾燥し、粉碎し、室温下にてクロロホルムで脱脂した後、メタノールで抽出した。

※50 【0018】メタノール抽出物 135gを蒸留水に溶解

5

し、ダイヤイオン HP-20(商品名)：三菱化成株式会社製)を充填したカラムに吸着させ、30%メタノール、70%メタノールで順次溶出した。

【0019】70%メタノール溶出物を、溶出溶媒としてメタノールを用いたセファデックスLH-20カラムクロマトグラフィー(商品名)：ファルマシア株式会社製)で分離し、新規イソフラボン誘導体を多く含む分画 555mg 得られた(原料納豆からの収率：0.016%)。

【0020】この分画をさらに、高速液体クロマトグラフィーを用いて、ODS系のカラムで分離し、三種の新規

イソフラボン誘導体(純度：99%以上)が得られた。
なお、イソフラボン誘導体の純度は、液体クロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーによる結果に基づいて決定した。

6

【0021】そして、各イソフラボン誘導体の理化学的分析を行った。

【0022】なお、分析手段に関して、NMR分析は JNM-GSX 270(日本電子株式会社製)、質量分析(FAB-MS)は JMS-SX 102(日本電子株式会社製)、および赤外吸収分析(IR)はIR-700(「KBr 錠剤法」：日本分光株式会社製)の各機器を用いた。

【0023】また、NMRデータに関する記載は、大豆イソフラボン配糖体(ゲニスチン)のNMRスペクトルデータ(下記表1)と各イソフラボン誘導体のNMRスペクトルデータ(表2～表4)との比較に基づいている。

【0024】

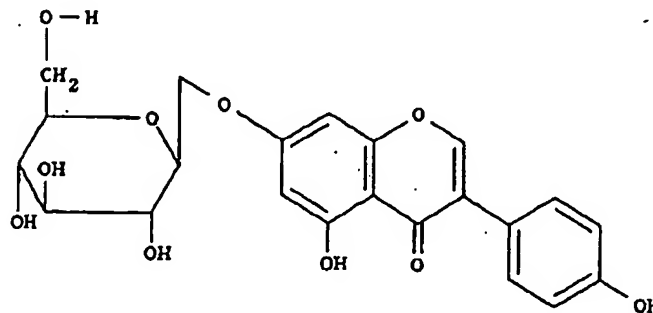
【表1】

☆【表1】

表1: ゲニステンのNMRデータおよび構造式

¹H-NMR δ (ppm): 8.13 (1H, s, 2-H), 7.38 (2H, d, J=8.4Hz, 2' and 6'-H),
 (CD₃OD, 270MHz) 6.84 (2H, d, J=8.4Hz, 3' and 5'-H),
 6.70 (1H, d, J=2.2Hz, 8-H),
 6.51 (1H, d, J=8.4Hz, 6-H),
 5.05 (1H, d, J=5.1Hz, 1'-H),
 3.91 (1H, dd, J=11.9 and 1.9Hz),
 3.71 (1H, dd, J=17.8 and 5.7Hz), 3.44-3.48 (4H, m)

¹³C-NMR δ (ppm): 180.5 (C-4), 163.0 (C-7), 161.6 (C-5), 157.5 (C-4'),
 (DMSO-d₆, 270MHz) 157.2 (C-9), 154.6 (C-2), 130.2 (C-2', 6'),
 122.6 (C-3), 121.0 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'),
 106.1 (C-10), 99.9 (C-1"), 99.6 (C-8), 94.5 (C-8),
 77.2 (C-5"), 76.4 (C-3"), 73.1 (C-2"), 69.8 (C-4"),
 60.6 (C-6")



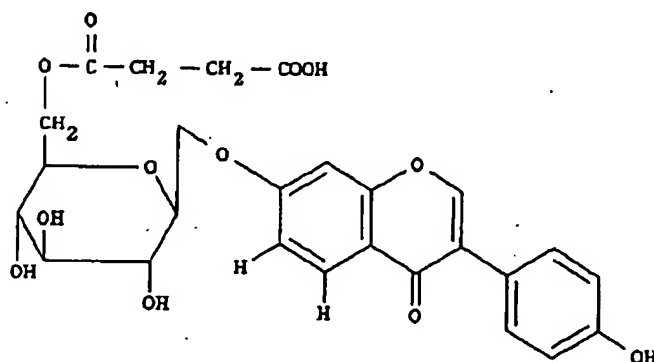
【0025】⑦ 7-(6-サクシニル β-グルコピラシノ * 【0026】
 ル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4 【表2】
 -オン *

☆【表2】

表2: 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンのNMRデータおよび構造式

¹H-NMR δ (ppm): 8.16 (1H, s, 2-H), 8.11 (1H, d, J=8.9Hz, 5-H),
 (CD₃OD, 270MHz) 7.37 (2H, d, J=8.6Hz, 2' and 6'-H),
 7.20 (1H, d, J=3.2Hz, 8-H),
 7.16 (1H, dd, J=8.9 and 2.4Hz, 6-H),
 6.84 (2H, d, J=8.4Hz, 3' and 5'-H),
 5.07 (1H, d, J=7.8Hz, 1''-H),
 4.54 (1H, dd, J=10.0 and 2.4Hz, 6''-H),
 4.20 (1H, dd, J=11.9 and 7.6Hz, 6''-HB),
 3.77 (1H, dt, J=7.6 and 2.4Hz, 5''-H),
 3.38-3.55 (3H, m, 2'', 3' and 4''-H),
 2.57-2.71 (4H, m, 2'' and 3''-H)

¹³C-NMR δ (ppm): 178.0 (C-4), 176.0 (C-4''), 174.0 (C-1''),
 (CD₃OD, 270MHz) 163.2 (C-7), 159.1 (C-4'), 158.7 (C-9),
 155.0 (C-2), 131.4 (C-2' 6'), 128.3 (C-5),
 126.1 (C-3), 124.1 (C-1'), 120.2 (C-10), 117.1 (C-6),
 116.2 (C-3', 5'), 104.9 (C-8), 101.6 (C-1''),
 77.7 (C-5''), 75.6 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.6 (C-4''),
 65.0 (C-6''), 30.1 (C-2''), 29.8 (C-3'')



【0027】上記表2の結果から、ゲニスチンのNMRスペクトルデータとの相違点は以下の通りであった。

【0028】¹H-NMR: (CD₃OD, 270MHz) ppm 表示の'δ'値。

【0029】8.11 (1H, d, J=8.9Hz, 5-H)、7.16 (1H, dd, J=8.9と2.4Hz, 6-H)において新しい信号の出現。

【0030】¹³C-NMR: (CD₃OD, 270MHz) ppm 表示の'δ'値。

【0031】128.3 (C-5)、120.2 (C-10)、117.1 (C-6)* 50

* において新しい信号の出現。

【0032】また、本化合物の融点、質量分析、および赤外吸収分析(最大吸収波長)に関しては、下記の数値が得られた。

【0033】融点: 231℃

FAB mass (m/z): 517 (C₂₅H₂₄O₁₂+H)⁺

IR ν (cm⁻¹): 3370, 2360, 2318, 1730, 1621, 1524, 1445, 1247, 1070, 885, 830.

② 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-5-ヒドロ

キシ-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4 *【0034】

-オン

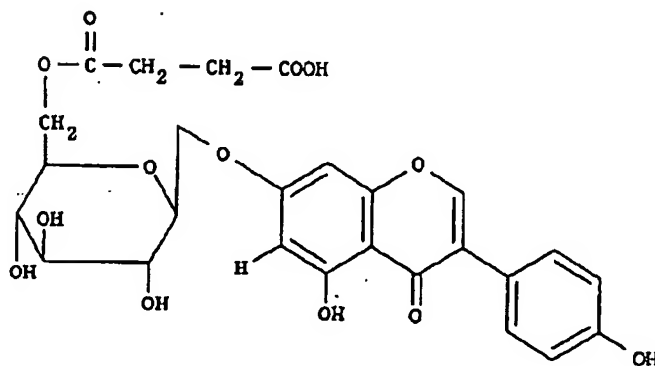
*【表3】

☆【表3】

表3: 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-5-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンのNMRデータおよび構造式

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 8.10 (1H, s, 2-H), 7.38 (2H, d, $J=8.1\text{Hz}$, 2' and 6'-H),
 (CD_3OD , 270MHz) 6.84 (2H, d, $J=7.8\text{Hz}$, 3' and 5'-H), 6.66 (1H, s, 8-H),
 6.48 (1H, d, $J=1.2\text{Hz}$, 6-H), 4.99 (1H, d, $J=5.1\text{Hz}$, 1'-H),
 4.55 (1H, dd, $J=10.3$ and 1.1Hz , 6''-HA),
 4.22 (1H, dd, $J=11.9$ and 7.6Hz , 6''-HB),
 3.71-3.76 (1H, m, 5''-H), 3.34-3.54 (3H, m, 2'', 3'' and 4''-H),
 2.60-2.68 (4H, m, 2'' and 3''-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 182.2 (C-4), 137.7 (C-1'' and 4''), 164.2 (C-7),
 (CD_3OD , 270MHz) 163.3 (C-5), 158.9 (C-4'), 158.6 (C-9),
 154.9 (C-2), 131.1 (C-2', 6'), 124.8 (C-3),
 122.7 (C-1'), 116.1 (C-3', 5'), 107.9 (C-10),
 101.2 (C-1''), 101.0 (C-6), 95.7 (C-8), 77.5 (C-5''),
 75.4 (C-3''), 74.3 (C-2''), 71.3 (C-4''), 64.7 (C-6''),
 30.0 (C-2''), 29.8 (C-3'')



【0035】上記表3の結果から、ゲニステインのNMR
 スペクトルデータとの相違点は以下の通りであった。

【0036】 $^1\text{H-NMR}$: (CD_3OD , 270MHz) ppm 表示
 の ' δ ' 値。

【0037】6.48 (1H, d, $J=1.2\text{Hz}$, 6-H)において新しい
 信号の出現。

【0038】 $^{13}\text{C-NMR}$: (CD_3OD , 270MHz) ppm 表示※50

※の ' δ ' 値。

【0039】163.3 (C-5)、107.9 (C-10)、101.0 (C-6)
 において新しい信号の出現。

【0040】また、本化合物の融点、質量分析、および
 赤外吸収分析(最大吸収波長)に関しては、下記の数値
 が得られた。

【0041】融点: 228℃

FAB mass (m/z) : 533 (C₂₅H₂₄O₁₃+H)⁺*ドロキシフェニル)-6-メトキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-
オンIR ν (cm⁻¹) : 3432, 1714, 1648, 1612, 1515, 144

【0042】

1, 1251, 1175, 1074, 837.

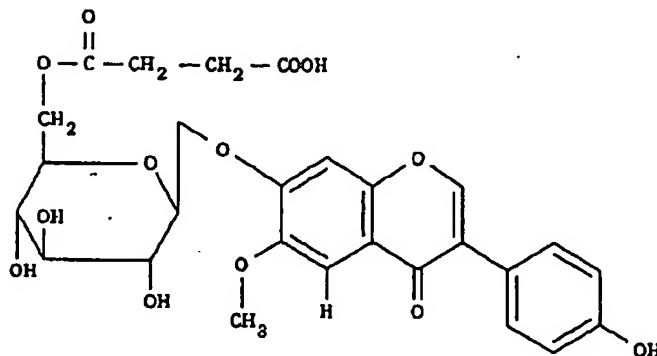
③ 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒ*

【表4】

☆【表4】

表4 : 7-(6-サクシニル-β-グルコピラシノル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-
6-メトキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オンのNMRデータおよび構造式

¹H-NMR δ (ppm) : 8.22 (1H, s, 2-H), 7.63 (1H, s, 5-H),
 (CD₃OD, 270MHz) 7.40 (2H, d, J=8.6Hz, 2' and 6'-H),
 7.33 (1H, s, 8-H), 6.85 (2H, d, J=8.9Hz, 3' and 5'-H),
 5.11 (1H, d, J=7.6Hz, 1''-H),
 4.53 (1H, dd, J=11.9, 1.9Hz, 6''-HA),
 4.19 (1H, dd, J=11.9, 7.6Hz, 6''-HB), 3.86 (3H, s, OMe-H),
 3.76-3.82 (1H, m, 5''-H),
 3.34-3.63 (3H, m, 2'', 3'' and 4''-H),
 2.56-2.71 (4H, m, 2'' and 3''-H)



【0043】上記表4の結果から、ゲニスチンのNMR
 スペクトルデータとの相違点は以下の通りであった。

※出現。

【0044】¹H-NMR : (CD₃OD, 270MHz) ppm 表示
 の 'δ' 値。

【0046】

【0045】3.86 (3H, s, OMe-H)において新しい信号の

【発明の効果】本発明により、発酵後の大豆(納豆)か
 ら得られた新規イソフラボン誘導体が提供されたことに
 より、従来のイソフラボン誘導体が呈する公知の生理学

的作用は勿論のこと、全く新規の生理学的作用も期待でき、さらには、イソフラボン誘導体の大豆の発酵過程に生ずる作用順序の解明の一助になり得るなど、産業的、

学術的に貢献し得るなど、種々の効果を奏するものである。

フロントページの続き

(72)発明者 奥平 武則
兵庫県神戸市北区惣山町4-6-8

(72)発明者 石田 均司
静岡県静岡市瀬名3107-2
(72)発明者 辻 邦郎
静岡県静岡市池田1375-11